

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



**Eliška Jandová**

Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin a jeho souvislost s neuropsychiatrickými  
chorobami

Molecular mechanism of circadian clock and its connection to neuropsychiatric disorders

Bakalářská práce

Školitel: doc. PharmDr. Alena Sumová, DSc.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 08. 2020

Podpis

Děkuji doc. PharmDr. Aleně Sumové, DSc. za neuvěřitelnou trpělivost, shovívavost a podporu při psaní této práce.

## Abstrakt

Cirkadiánní rytmy, které probíhají s periodou 24 hodin, jsou u savců řízeny hlavními hodinami uloženými v oblasti suprachiasmatických jader (SCN) a periferními oscilátory. Základním molekulárním mechanismem řízení cirkadiánních rytmů je zpětnovazebná transkripčně-translační smyčka hodinových genů *Clock*, *Bmal1*, *Per* a *Cry*. Dimer proteinů CLOCK-BMAL1 funguje jako aktivátor transkripce genů *Per* a *Cry*, které zpětně inhibují tento dimer, a tudíž i vlastní transkripci. Tato hlavní smyčka ovlivňuje další geny, které se podílejí na její vlastní regulaci. Funkce, jaderná lokalizace a stabilita hodinových genů je ovlivněna řadou postranskripčních a postranslačních modifikací. Jedním z procesů, které tato smyčka ovlivňuje, je spánek. Poruchy spánku jsou úzce spojeny s neuropsychiatrickými poruchami včetně onemocnění autistického spektra a s ním spojených syndromů, což nasvědčuje na souvislosti mezi poruchou regulace hodinových genů a těmito poruchami.

**Klíčová slova:** cirkadiánní hodiny, suprachiasmatická jádra, hodinové geny, transkripčně-translační zpětnovazebná smyčka, neuropsychiatrické choroby

## Abstract

Circadian rhythms, which are running with a period of 24 hours, are in mammals controlled via principal clock located in the area of suprachiasmatic nuclei (SCN) and peripheral oscillators. The basic molecular mechanism governing the circadian rhythms is the transcriptional-translational feedback loop of clock genes *Clock*, *Bmal1*, *Per* and *Cry*. The CLOCK-BMAL1 protein dimer acts as an activator for the transcription of the *Per* and *Cry* genes, which retroactively inhibit this dimer and thus its own transcription. This main loop affects other genes that are involved in regulation of the core loop. The function, nuclear localization and stability of clock genes are affected by a number of postranscriptional and postranslational modifications. Sleep disorders, one of the main processes controlled by the clock genes, accompany many neuropsychiatric disorders, including autism spectrum disorder. The development of these disorders have been associated with the clock genes or their interactions with other genes that play a major role in development of these disorders.

**Keywords:** circadian clock, suprachiasmatic nuclei, clock genes, transcriptional-translational feedback loop, neuropsychiatric diseases

# Obsah

Abstrakt .....	...
Seznam použitých zkratk .....	...
1 Úvod .....	1
2 Cirkadiánní hodiny savců .....	2
2.1 Molekulární mechanismus hodin .....	3
2.1.1 <i>Clock a Bmal1</i> .....	5
2.1.2 <i>Per a Cry</i> .....	6
2.1.3 <i>Npas2 a Bmal2</i> .....	7
2.2 Další geny související s funkcí hodin .....	8
2.2.1 <i>Chrono</i> .....	8
2.2.2 <i>Tim</i> .....	8
2.2.3 <i>Rev-erb a Ror</i> .....	8
2.2.4 <i>Dec1 a Dec2</i> .....	9
2.2.5 bZip transkripční faktory .....	10
3 Postranskripční modifikace .....	10
4 Postranlační modifikace .....	11
4.1.1 Fosforylace .....	11
4.1.2 Acetylace a deacetylace .....	12
4.1.3 Další postranlační modifikace .....	13
5 Neuropsychiatrické choroby .....	14
5.1 Onemocnění autistického spektra (ASD) .....	16
5.2 Vztah cirkadiánního systému s ASD .....	17
5.2.1 SHANK3 ovlivňuje transkripci hodinových genů .....	18
5.2.2 UBE3A mutace způsobuje Angelmanův syndrom .....	19
5.2.3 Cloud lncRNA 116HG působí jako transkripční faktor na hodinové geny u Prader-Williho syndromu .....	19
6 Závěr .....	21
7 Bibliografie .....	22

## Seznam použitých zkratek

ADHD	Attention Deficit Hyperactivity Disorder
ADP	Adenosine diphosphate
AMPK	5' Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase
ARF-BP1	Arf-binding protein 1
ASD	Autism Spectrum Disorder
bHLH	basic Helix-Loop-Helix domain
<i>Bmal1/Mop3</i>	Brain And Muscle ARNT-Like 1/Member Of Pas Protein 3
<i>Bmal2</i>	Brain And Muscle ARNT-Like 2
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CBP	CREB-Binding Protein
ccgs	clock controled genes
CIPC	CLOCK Interacting Pacemaker
CK1 $\epsilon/\delta/\alpha$	Casein Kinase1 $\epsilon/\delta/\alpha$
<i>Clock</i>	Circadian Locomoter Output Cycles Protein Kaput
CRE	cAMP Response Element
CREB	cAMP Response Element – Binding Protein
<i>Cry</i>	Cryptochrome
CUL4	Cullin 4
<i>Dbp</i>	D-Box Binding Protein

DDB1	Damage Specific DNA Binding Protein 1
<i>Dec1/2</i>	Deleted In Esophageal Cancer 1/2
DSPS	Delayed Sleep Phase Syndrome
FAD	Flavin adenine dinucleotide binding domain
FASPS	Familial Advanced Sleep-Phase Syndrome
FBXL3/21	F-Box And Leucine Rich Repeat Protein 3/21
FMR1	FMRP Translational Regulator 1
GATAD2A	GATA Zinc Finger Domain Containing 2A
GSK3- $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3- $\beta$
HBII-85/SNORD116	Small Nucleolar RNA, C/D Box 116 Cluster
HDAC1/3	Histone Deacetylase 1/3
HP1 $\gamma$	Heterochromatin Protein 1 $\gamma$
CHD4	Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 4
<i>Chrono/Gm129</i>	Chromosome 1 Open Reading Frame 51/Gene Model 129
ipRGC	intrinsically photosensitive retinal ganglion cells
JARID1	Jumonji/ARID Domain-Containing Protein 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MBD2	Methyl-CpG Binding Domain Protein

MECP2	Methyl-CpG Binding Protein 2
MLL1	Myeloid/Lymphoid or Mixed Lineage Leukemia 1
MTA2	Metastasis Associated 1 Family Member 2
<i>mTor</i>	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase
NCoR	Nuclear Receptor Corepressor
<i>Nfil3/E4bp4</i>	Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated / E4 Promoter-Binding Protein 4
<i>Nlgn3/4</i>	Neurologin 3/4
<i>Npas2</i>	Neuronal PAS Domain Protein 2
NuRD	Mi-2-nucleosome remodeling and deacetylase transcriptional co-repressor complex
NURR1	Nuclear Receptor Related-1 Protein
OGT	O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase
PACAP/PACAP-R 1	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide/Receptor 1
PKA	Protein Kinase A
PAM	Peptidylglycine Alpha-Amidating Monooxygenase
PAR bZip	Proline And Acidic Amino Acid-Rich Basic Leucine Zipper
PARR-1	Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1
PAS	Per-Arnt-Sim domain



pCAF	p300/CBP-Associated Factor
<i>Per</i>	Period
PHL	Photolyase domain
PKC	Protein Kinase C
PMS	Phelan-McDemid syndrome
PWS	Prader-Willi syndrome
RBAP48	RB Binding Protein 4, Chromatin Remodeling Factor
RBBP5	RB Binding Protein 5, Histone Lysine Methyltransferase Complex Subunit
<i>Rev-erb/Nr1d1</i>	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
<i>Ror/Nr1d2</i>	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 2
RORE	ROR/REV-ERB Response Element
SCF E3 ubiquitin ligase	SKP1-CUL1-F-box protein E3 ubiquitin- protein ligase
SCN	suprachiasmatic nuclei
SHANK3	SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains Protein 3
SIN3-HDAC	SIN3-Histone Deacetylase
SIRT1	Sirtuin 1
SUMO 2/3	Small Ubiquitin Like Modifier 2/3
TAD	transactivated domain

*Tim*

Timeless

TSC1/TSC2

TSC Complex Subunit 1/TSC Complex  
Subunit 2

UBE3A

Ubiquitin Protein Ligase E3A

Wnt

Wingless-Type MMTV Integration Site  
Family

$\beta$ TrCP1/2

$\beta$ -Transducin Repeat Containing E3  
Ubiquitin Protein Ligase

# 1 Úvod

Hlavním molekulárním mechanismem řízení cirkadiánních rytmů je zpětnovazebná transkripčně-translační smyčka hodinových genů. Proteiny genů *Clock* (Gekakis, 1998) a *Bmal1* se spojují v heterodimer, který po nasednutí na E-box v promotoru genů (Hogenesch et al., 1998) funguje jako aktivační transkripční faktor. V rámci hodinového mechanismu aktivuje transkripci genů tvořící negativní část hlavní smyčky *Per* a *Cry*. Kromě toho aktivuje transkripci i dalších genů s E-box v promotorech, tzv. hodinami kontrolovaných genů. PER a CRY proteiny vytvářejí komplex (Shearman, 2000), který je schopný inhibovat transaktivační funkci dimeru CLOCK-BMAL1 a inhibují tak vlastní transkripci. Součástí složitého mechanismu hodin jsou i geny *Chrono*, *Tim*, *Rev-erb*, *Ror*, *Dec1*, *Dec2*, *Nfil3* a transkripční faktory rodiny PAR bZip, které se podílejí na regulaci hlavní smyčky (Engelen et al., 2013; Goriki et al., 2014; Guillaumond et al., 2005; Honma et al., 2002; Mitsui et al., 2001; Yamaguchi et al., 2000). Důležitou roli zde hrají i postranskripční a postranlační modifikace hodinových genů. Fosforylace, acetylce, sumoylace a ubiquitinace jsou jedny z nejvýznamnějších postranlačních modifikací, které se podílejí na určování stability proteinů, jaderné lokalizaci a funkci.

Poruchy spánku často doprovázejí mnoho neuropsychiatrických poruch včetně onemocnění autistického spektra a syndromů s ním spojených, což vede k hledání souvislostí mezi hodinovými geny a geny, které tato onemocnění způsobují. Mutace v *Shank3*, způsobující Phelan-McDemid syndrom, ovlivňuje hladinu exprese hodinových genů, což vede k problémům s usínáním a udržením spánku (Ingiosi et al., 2019). UBE3A ligáza hraje roli v regulaci hodinových genů a její mutace jsou spojovány s Angelmanovým syndromem (Shi et al., 2015). Ztráta nekódující RNA způsobující Prader-Williho syndrom ovlivňuje hladinu exprese hodinových genů (Powell et al., 2013).

Cílem práce je představit složitý a komplexní molekulární mechanismus řízení cirkadiánních rytmů a poukázat na souvislosti neuropsychiatrických chorob, konkrétně onemocnění autistického spektra, s hodinovými geny.

## 2 Cirkadiánní hodiny savců

Cirkadiánními rytmy rozumíme rytmy, které v těle organismů probíhají s periodou přibližně 24 hodin, např. spánek a uvolňování hormonů. Hlavním centrem těchto rytmů u savců jsou suprachiasmatická jádra hypotalamu (SCN) (Moore and Eichler, 1972; Stephan and Zucker, 1972). Zde dochází vlivem působení hodinových genů ke vzniku a regulaci těchto periodických signálů.

Periodický signál není generován jen hlavními hodinami v SCN, ale i periferními oscilátory (Balsalobre et al., 1998), které se nacházejí v různých orgánech např. v ledvinách a játrech. Tyto periferní oscilátory jsou schopny generovat signál autonomně, jsou však podřízeny synchronizaci ze SCN (Yamazaki, 2000; Yoo et al., 2004). Vyjma toho mohou mít i vlastní regulační dráhy, které je seřizují – např. příjem potravy, teplota, atd. (Balsalobre, 2000; Buhr et al., 2010; Damiola et al., 2000; shrnuto v Dibner et al., 2010). Transplantačními pokusy bylo potvrzeno, že právě SCN jsou u savců centrem řízení těchto rytmů (Ralph et al., 1990). Chirurgickým odstraněním jader dochází ke ztrátě rytmicity, naopak po transplantaci funkčních jader dárce dochází u arytmiického příjemce k obnově rytmu, a to s periodou, která odpovídala periodě dárce transplantátu. Autonomní podstata rytmicity SCN byla prokázána pokusy s Halaszovým nožem, kterým byl vyizolován malý ostrůvek hypotalamu obsahující SCN. Tento ostrov byl oddělen od zbývajících částí mozku, a i přes to vykazoval rytmické signály (Inouye and Kawamura, 1979).

I když pacemaker funguje jako autonomní jednotka, pro potřeby fungování organismu v proměnném prostředí je třeba synchronizace s vnějšími vlivy, např. s cyklem světla a tmy, nebo dobou dostupnosti potravy. Takový proces označujeme anglickým termínem entrainment. Nejvýznamnějším synchronizačním vlivem hlavního pacemakeru je světelný signál. Tato synchronizace je zprostředkována působením světla na sítnici oka, kde působí na systém tyčinek a čípků a fotoreceptivní retinální gangliové buňky (ipRGCs), které obsahují fotosenzitivní pigment melanopsin (Berson, 2002; Hattar et al., 2002). Jejich axony se spojují v optický nerv a informaci, kterou tyto buňky přijmou, posílají retinohypotalamickým traktem do SCN (shrnutí v Lowrey and Takahashi, 2011). Signalizace zde probíhá prostřednictvím působení neurotransmiterů PACAP, které stimulují produkci cAMP přes PACAP-R1 receptor a glutamát a jeho receptory spojené s  $\text{Ca}^{2+}$  / calmodulin signální dráhou (von Gall et al., 1998). Tato signalizace vede k aktivaci serin/threoninových kináz (konkrétně PKA – protein kinázy A), které jsou schopné

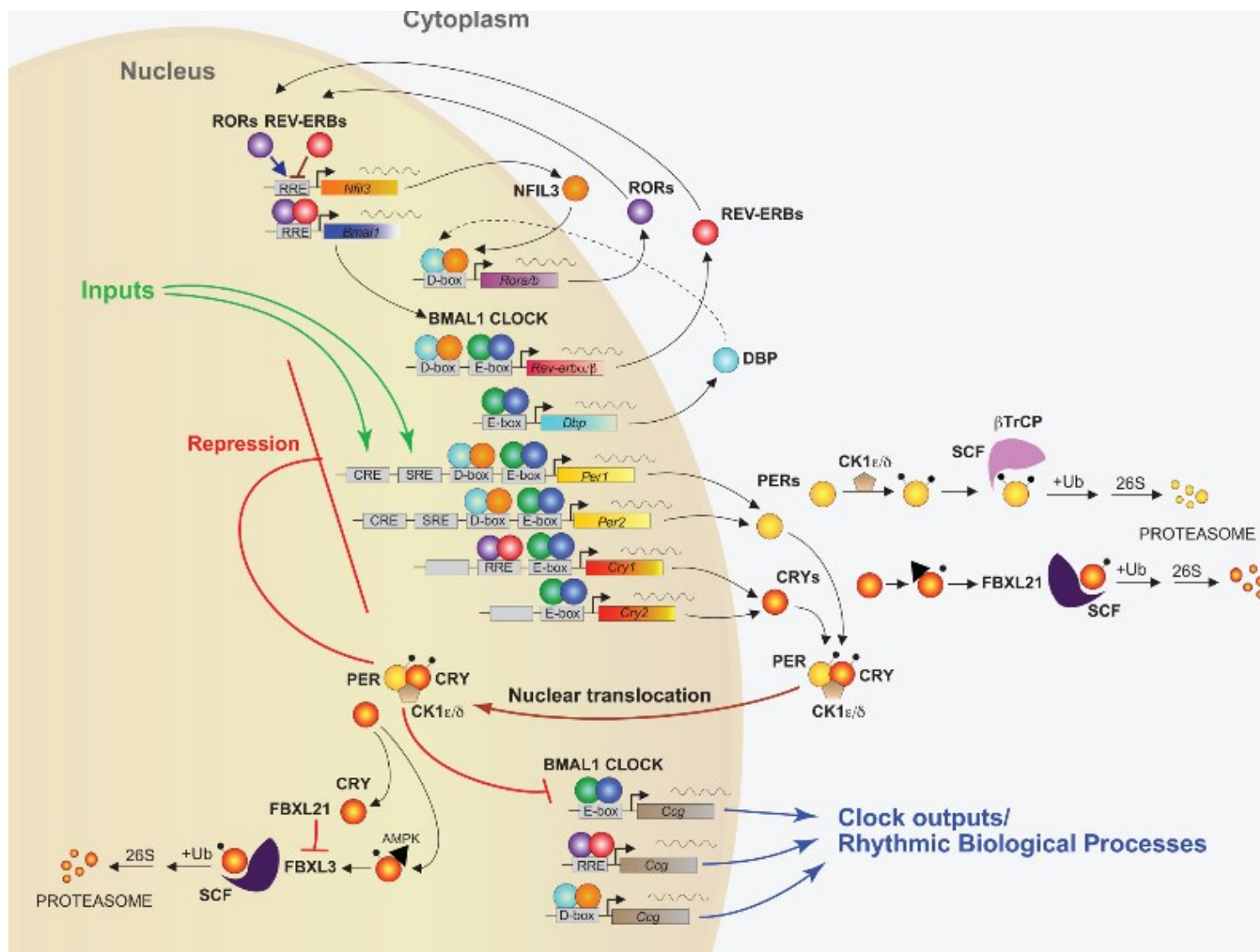
fosforylovat CREB protein na Ser133. Mutace (např. bodová výměna serinu za adenin) v tomto místě mohou vést k opoždění fáze hodin (Gonzalez and Montminy, 1989). CREB patří do rodiny leucinových zipů, který se po fosforylaci váže na palindromickou oblast 5' TGACGTCA 3' CRE elementu (Deutsch et al., 1988). Tuto oblast nacházíme v promotoru genů *Per1* a *Per2*. CRE dependentní transkripce probíhá během subjektivní noci, kdy světlo hodiny v SCN seřizuje (shrnutí v Habener, 1990).

U savců hraje v řízení cyklu spánku a bdění určitou úlohu hormon melatonin (shrnutí v Zisapel, 2007), který funguje jako signální molekula spánkového režimu, připravující organismus na usnutí prostřednictvím snížení tělesné teploty a zvýšením ospalosti (Lavie, 1997; Wesensten et al., 2005). Syntéza melatoninu probíhá v epifýze (Lerner et al., 1958) z tryptofanu (Axelrod, 1974) a řízena je SCN (Klein and Moore, 1979; Roseboom et al., 1996). Tryptophan je konvertován na 5-hydroxytryptophan tryptophan hydroxylázou, následně dekarboxylován na serotonin, arylalkylamine-N-acetyltransferázou přeměněn na N-acetylserotonin a hydroxyindole-O-methyl transferázou na melatonin. Hladina melatoninu je nejvyšší během tmavé části dne, naopak světlo syntézu inhibuje (Bartness and Goldman, 1989; Riemann et al., 2002). Narušení komplexního mechanismu řídícího cirkadiální rytmy vede k narušení produkce melatoninu. Inhibice produkce melatoninu může souviset s poruchami spánku (shrnutí v Zisapel, 2000).

## **2.1 Molekulární mechanismus hodin**

Hlavním molekulárním mechanismem, kterým je periodický signál generován a regulován, je transkripčně-translační zpětnovazebná smyčka hodinových genů.

Rozlišujeme tzv. core hodinové geny, které tvoří základ hodinového mechanismu. Tato smyčka je tvořena geny *Clock*, *Bmal1* (známý také jako *Mop3*), *Per* (*Per1*, 2, 3) a *Cry* (*Cry1*, 2). Mechanismu vzniku rytmického signálu se však účastní kromě těchto genů řada dalších molekul, které se podílejí na regulaci hlavní smyčky a postranslačních modifikací. Schéma komplexní sítě fungování cirkadiálních hodin ukazuje obrázek 1.



**Obrázek 1:** Schéma fungování cirkadiálních hodin savců. Vnější signály (zelená dráha) aktivují transkripci vazbou na CRE element genů *Per* (žluté kolečko označuje PER protein). CLOCK (modré kolečko) a BMAL1 (zelené kolečko) proteiny se váží na E-box promotoru a aktivují tak transkripci *Per*, *Cry* (žluto-oranžové kolečko označuje protein CRY), *Rev-erb* (červené kolečko označuje protein REV-ERB), *Dbp* (světle modré kolečko označuje protein DBP) a hodinami kontrolovaných genů – (anglický termín clock controlled genes (ccgs)). REV-ERB inhibují transkripci *Nfil3* (oranžové kolečko označuje protein NFIL3), *Bmal1*, *Cry1* a hodinami kontrolovaných genů (ccgs). ROR (fialové kolečko) aktivuje transkripci *Nfil3*, *Bmal1*, *Cry1* a hodinami kontrolovaných genů (ccgs). NFIL3 společně s DBP ovlivňují transkripci *Rev-erb*, *Ror*, *Per* a hodinami kontrolovaných genů (ccgs). Komplex PER-CRY je fosforylován CK1ε/δ, vstupuje do jádra, kde inhibuje transkripční funkci CLOCK-BMAL1. Fosforylace PER CK1ε/δ vede k vazbě βTrCP, ubiquitinaci a degradaci. Fosforylovaný CRY kinázou AMPK je degradován po vazbě FBXL3 a FBXL21 (převzato z práce Cox and Takahashi, 2019).

### 2.1.1 *Clock a Bmal1*

Geny *Clock* (King et al., 1997) a *Bmal1* tvoří pozitivní část hlavní regulační smyčky. Proteiny CLOCK a BMAL1 se spojují v heterodimer a fungují jako aktivační transkripční faktory genů kódující proteiny patřící k negativní části hlavní regulační smyčky – *Per* a *Cry*. Jedná se o tzv. bHLH-PAS proteiny, to znamená, že obsahují domény Per-Arnt-SIM (PAS) - PAS-A a PAS-B, díky kterým jsou schopny vytvářet dimery a basic helix-loop-helix (bHLH) DNA vazebnou doménu, kterou se váží na enhancerovou oblast E-boxu 5' CACGTG 3' jiných genů (Gekakis, 1998; Hogenesch et al., 1998). Tvorba dimeru a jaderná lokalizace je stimulována  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní protein kinázou C (PKC) (Lee et al., 2010).

Dimer CLOCK-BMAL1 označujeme jako pioneer-like (Menet et al., 2014) transkripční faktor, je totiž schopný vázat se na nukleozom, aniž by byl nějakým způsobem rozvolněn. Až vazba dimeru vede k remodelaci chromatinu. Remodelace je zajištěna histon modifikujícími enzymy, které způsobují převážně acetylaci Lys9 a Lys27 a trimethylaci Lys4 histonu H3 (shrnutí v Trott and Menet, 2018). Enzymy společně s dalšími koaktivátory vytvářejí s CLOCK-BMAL1 velký transkripci aktivující komplex. Do tohoto komplexu patří i CBP histon acetyltransferáza (Lee et al., 2010), histon acetyl transferáza p300 podílející se na acetylaci histonu H3 (Etchegaray et al., 2003), histon lysin demetyláza JARID1, která blokuje deacetylaci histon deacetylázou 1 (HDAC 1) (Ditacchio et al., 2011) a MLL1 metyltransferáza, která se podílí na trimethylaci Lys4 histonu H3 (Katada and Sassone-Corsi, 2010). Hosoda *et al.* (2009) dokázal ve své studii, že se CBP a p300 v přítomnosti transkripčního aktivátoru pCAF vážou na CLOCK a aktivují transkripci, ale v přítomnosti nadměrně exprimované histon deacetylázy 3 (HDAC 3) fungují jako inhibitory funkce CLOCK-BMAL1 (Hosoda et al., 2009). Sám CLOCK má funkci histon acetyltransferázy, díky přítomnosti obdoby motivu A (acetyl koenzym vazebný motiv), který je typický pro histon acetyl transferázy, na C-terminálním konci bohatém na glutamin. Podílí se na acetylaci Lys9 a Lys14 histonu H3 (Doi et al., 2006). Modifikace histonů vedou k následnému rozvolnění nukleozomu, asociaci transkripčních koaktivátorů a RNA polymerázy II.

Aktivita dimeru CLOCK-BMAL1 v SCN je největší ve světelné fázi dne, kdy dochází i k největší transkripci core hodinových genů. Kromě hodinových genů hrajících roli v centrální smyčce, ovlivňuje tento dimer hodinami kontrolované geny (clock controlled genes (ccgs)) např. *Dbp* (z rodiny PAR bZip transkripčních faktorů) a gen pro neuropeptid vasopresin. Zde CLOCK-BMAL1 nehraje roli aktivátoru transkripce, ale pouze molekuly,

kteřá svou vazbou umožňuje rozvolnění chromatinu, které vede k odhalení vazebných míst pro jiné transkripční aktivátory. Až ty jsou schopné zahájit transkripci těchto hodinami kontrolovaných genů. Tato regulace umožňuje zpoždění v produkci hodinami kontrolovaných genů, které mohou být transkribovány až v tmavé fázi dne (Trott and Menet, 2018).

### 2.1.2 *Per a Cry*

Geny *Per* a *Cry* tvoří negativní část zpětnovazebné transkripčně-translační smyčky hodin. Na E-box promotorů těchto genů nasedá dimer CLOCK-BMAL1 (Gekakis, 1998; Shearman, 2000) během světelné fáze dne a aktivuje tak jejich transkripci, což vyústí k akumulaci proteinů PER a CRY v době večera (shrnutí v Takahashi, 2017). PER a CRY se spojují v dimer, který se váže na CLOCK-BMAL1, čímž inhibují vlastní transkripci. Navíc tvorba dimeru je nutná pro jeho jadernou lokalizaci (Kume et al., 1999). Vyjma tvorby dimeru PER-CRY, je PER schopný díky přítomnosti PAS domény vytvářet homodimery PER-PER (Shearman et al., 1997).

Na jakém principu funguje inhibice dimerem PER-CRY není přesně známo. PER komplex vázající se na CLOCK-BMAL1 sestává z nejméně 25 proteinů (Brown, 2005; Etchegaray et al., 2006; Kim et al., 2014; Padmanabhan et al., 2012). Významnou roli hraje CRY1. Poslední studie ukazují významné interakce právě mezi CRY1 a CLOCK-BMAL1 dimerem (Michael et al., 2017; Rosensweig et al., 2018; Xu et al., 2015). CRY všech organismů sdílí Photolyase homology region (PHL) na C-terminálním coiled-coil-like helixu, avšak funkcí se liší. Tato oblast savčího CRY1 interaguje s HI smyčkou CLOCK (Rosenweig et al., 2018), což vede nejspíše k přiblížení CRY1 k TAD (C-terminální transaktivační doména) BMAL1 (Xu et al., 2015), což vede ke vzniku ternárního komplexu, který nejspíše stabilizuje inhibiční schopnost CRY1 (Michael et al., 2017). Jedním z ko-represorů komplexu PER je Mi-2-nucleosome remodeling and deacetylase transcriptional co-repressor complex (NuRD) (Kim et al., 2014). Tento komplex působí na pozitivní i negativní část zpětnovazebné smyčky. Podjednotky CHD4 (chromodomain-helicase-DNA-binding 4) a MTA2 (metastasis-associated 1 family member 2) se váží na CLOCK-BMAL1 a CHD4 podporuje transaktivační funkci dimeru. Tyto dvě podjednotky se v komplexu PER nenacházejí. Nacházíme zde podjednotky MBD2 (methyl-CpG-binding domain protein 2), GATAD2A (GATA zinc finger domain-containing protein 2A), histon deacetylázu 1 (HDAC1) a RBAP48 (retinoblastoma-binding protein p48). Při vazbě komplexu PER na CLOCK-BMAL1 dochází ke spojení podjednotek, což vede k přepnutí funkce CHD4



z aktivační na inhibiční (shrnutí v Takahashi, 2017). Vazba komplexu PER vede k remodelaci chromatinu asociací např. se SIN3-HDAC deacetylázou (Duong et al., 2011) a HP1 $\gamma$  histon metyltransferázou (Duong and Weitz, 2014), což vede k deacetylaci Lys9 histonu H3 a Lys5 histonu H4, dimethylaci a trimethylaci Lys9 histonu H3. Inhibice CLOCK-BMAL1 dimeru je složitý proces pro který je nutná vazba komplexu PER s dalšími chromatin modifikujícími komplexy a ko-represory (shrnutí v Takahashi, 2017).

Tvorba dimeru PER-CRY vede ke stabilizaci obou partnerů a umožňuje jadernou lokalizaci. Pouze fosforylovaný PER v komplexu s CRY je schopný vstupovat do jádra. CRY se váže na C-terminální konec PER vzdáleného od vazebného místa pro kinázu CK1 $\epsilon$ , což umožňuje vznik ternárního komplexu (Akashi et al., 2002). Tvorba komplexu umožní transport CRY do jádra a jeho fosforylaci (Eide et al., 2002). Fosforylace PER zprostředkovaná CK1, který není v komplexu s CRY, vede k jeho degradaci, obdobně jako fosforylace CRY AMPK kinázou (Lamia et al., 2009).

### 2.1.3 *Npas2* a *Bmal2*

Dalším důležitým článkem tvořícím komplexní oscilační signály jsou homologní geny. *Npas2* je homologem genu *Clock* a dokáže vytvářet dimery s BMAL1. Jedná se o gen z rodiny bHLH-PAS. Funkce i regulace dimeru NPAS2-BMAL1 je obdobná jako u dimeru CLOCK-BMAL1. Funguje jako aktivátor transkripce *Per* a *Cry* a inhibován je dimerem PER-CRY (Reick, 2001).

*Bmal2* je homologem genu *Bmal1* a exprimován je v mozku plodu a v játrech dospělého jedince (Ikeda et al., 2000). Kratší forma *Bmal2b* (oproti *Bmal2* neobsahuje PAS – B doménu) byla nalezena v SCN myši, ale neprokázala se u ní schopnost aktivovat transkripci *Per* tvorbou dimeru s CLOCK, naopak slabě inhibovala transaktivační funkci dimeru BMAL1-CLOCK. Ačkoliv se jedná o homolog, jeho role je nejspíše odlišná od role *Bmal1* (Ikeda et al., 2000; Sasaki et al., 2009).

## 2.2 Další geny související s funkcí hodin

Jedná se o geny, které jsou rytmicky exprimované a podílejí se na regulaci hodin.

### 2.2.1 *Chrono*

CHRONO (označovaný také jako GM129) má obdobnou funkci jako CRY2, inhibuje transaktivační funkci dimeru CLOCK-BMAL1 vazbou na BMAL1. Goriki *et al.* (2014) ve své práci ukazuje, že inhibice vlivem CHRONO a CRY2 má nejspíše rozdílný mechanismus a souvisí s histon deacetylázou 1 (HDAC 1). Při inhibici HDAC 1 k inhibici vlivem CHRONO nedochází, oproti tomu inhibiční schopnost CRY2 nebyla ovlivněna. Inhibice funkce CHRONO vede k prodloužení periody (Goriki *et al.*, 2014).

### 2.2.2 *Tim*

*Timeles* řadíme mezi geny, které se nepodílejí na centrální smyčce, ale jsou s ní propojeny. Savčí *Tim* odpovídá paralogu *Drosophila melanogaster Tim2*, který stejně jako savčí *Tim* není součástí core smyčky. TIM se váže svým N-terminálním koncem na C-terminální coiled coil doménu CRY1. Do tohoto místa se váže i PER2, který má ovšem k místu větší afinitu než TIM, dochází zde ke kompetici. Vazba vede k inhibici vazebného místa pro PER2, což vede k destabilizaci komplexu PER-CRY v cytoplazmě a postranlačním modifikacím (Engelen *et al.*, 2013). Mutace *Tim* jsou spojovány se syndromem předběhnutí spánkové fáze – familial advanced sleep phase syndrome (FASPS) (Kurien *et al.*, 2019). Jedinci s tímto syndromem usínají velmi brzy a velmi brzy i vstávají, uvolňování melatoninu u nich totiž předbíhá o 3 až 4 hodiny oproti zdravým subjektům (Jones *et al.*, 1999). *Tim* nacházíme i v periferních oscilátorech, hlavně v těch schopných proliferace např. thymus, varlata (Engelen *et al.*, 2013).

### 2.2.3 *Rev-erb a Ror*

Jaderné receptory REV-ERB a ROR se váží na RORE oblasti genu *Bmal1* a vzájemnou kompeticí ovlivňují jeho transkripci (Guillaumond *et al.*, 2005). ROR se podílejí na aktivaci transkripce a rozlišujeme celkem tři členy této rodiny – *Rora*, *Rorb* a *Rorc*. *Rora* je exprimován v SCN a na aktivaci transkripce se podílí nejvíce z této rodiny receptorů. *Rorb* je také exprimován v SCN, nacházíme ho ale i v jiných částech hypothalamu, mozkové kůře a retině. *Rorc* je exprimován jen v játrech, nepodílí se tedy na regulaci hlavní smyčky v SCN a pravděpodobně má i odlišnou funkci oproti *Rora* a *Rorb*. REV-ERB $\alpha$  a REV-ERB $\beta$  svou vazbou na RORE inhibují transkripci, REV-ERB $\beta$  silněji než REV-ERB $\alpha$  (shrnutí v Liu *et al.*, 2008).

Nepřítomnost *Rev-erba* a  $\beta$  vede ke ztrátě rytmicity *Bmal1*, oproti tomu ztráta RORs nevykazuje významnou ztrátu rytmicity. Vyřazením genů *Rev-erb* z funkce (knock-out) se ukázalo, že ačkoliv došlo ke ztrátě rytmicity exprese *Bmal1*, vliv na rytmicitu exprese *Per* a *Cry*, které BMAL1 ovlivňuje, nebyl pozorován (Liu et al., 2008).

RORE oblasti, na které se RORs a REV-ERBs váží nacházíme celkem dvě. RORE1 (5'AAAGTAGGTTA3') na kterou se preferenčně váží receptory rodiny ROR a RORE2 (5'AAAGTAGGTCA3'). Na RORE2 se váží obě rodiny receptorů, vazba REV-ERBs je zde ale silnější než RORs (Guillaumond et al., 2005). Vazebná místa pro tyto nukleární receptory nacházíme i u *Cry1*. Tato vazebná místa jsou celkem tři a podílejí se na rozdílné transkripční hladině genu *Per* a *Cry* (Etchegaray et al., 2003).

ROR $\alpha$  a REV-ERB $\alpha$  hrají roli i v regulaci *Npas2*, homologu *Clock*. V oblasti promotoru *Npas2* nacházíme dvě oblasti RORE, na které se tyto receptory váží. Regulace *Npas2* a *Bmal1* se však liší. ROREs v promotoru *Bmal1* jsou od sebe odděleny 26bp dlouhým úsekem, což umožňuje vazbu REV-ERBs s korepresorem NCoR a histon deacetylázou 3 (HDAC 3) a následnou represi. RORE v promotoru *Npas2* jsou od sebe odděleny 160bp dlouhým úsekem, což neumožňuje represi, která by byla zprostředkována obdobně jako u *Bmal1*. Zde se tedy usuzuje, že vazba REV-ERBs funguje na principu znemožnění vazby RORs (Crumbley et al., 2010).

#### 2.2.4 *Dec1* a *Dec2*

Geny *Dec1* a *Dec2* fungují jako regulátory transkripce *Per1* interakcí protein-protein s BMAL1, nebo kompeticí o vazebné místo na E-boxu promotoru *Per1* s CLOCK-BMAL1 (Honma et al., 2002). Jsou to transkripční faktory s basic helix-loop-helix doménou a oproti jiným zástupcům z této rodiny (např. *Hairy Drosophila melanogaster*) neobsahují WRPW (Trp-Arg-Pro-Trp) doménu na C-konci, která umožňuje vazbu korepresorů. Regulační smyčka pomocí *Dec* funguje na bázi inhibice transaktivace dimerem CLOCK-BMAL1 genu *Per* (Honma et al., 2002).

### 2.2.5 bZip transkripční faktory

Jak již bylo výše v kapitole 2.1.1. zmíněno, *Dbp* je jedním z hodinami kontrolovaných genů, který kóduje transkripční faktor DBP. Na E-box v promotoru genu se váže dimer CLOCK-BMAL1 a působí jako aktivátor transkripce, zároveň je schopený se na promotor vázat i CRY1, který vazbou zpožďuje aktivaci transkripce zprostředkovanou CLOCK-BMAL1 (Stratmann et al., 2010). DBP svou vazbou na D-box aktivuje transkripci *Cry* a zároveň je schopený koaktivovat transkripci *Per1*, ale to jen v momentě, kdy je jeho produkce pozitivně ovlivňována dimerem CLOCK-BMAL1. Suprese CLOCK-BMAL1 během odpoledne vede k poklesu DBP, tudíž i k poklesu regulace transkripce *Per* (Yamaguchi et al., 2000). Jedná se o molekulu rodiny PAR bZip transkripčních faktorů, pro které je typická C-terminální basic DNA vazebná doména, dimerizační doména leucinového zipu a N-terminální doména bohatá na prolin a kyselé aminokyseliny (PAR) (Mueller et al., 1990). K této rodině patří i transkripční faktory *Hlf* (Hunger et al., 1992) a *Tef* (Drolet et al., 1991), které jsou stejně jako *Dbp* pozitivně ovlivňovány dimerem CLOCK-BMAL1. *E4bp4* (známý také jako *Nfil3*), který je podobný *Dbp*, ale neobsahuje PAR doménu, funguje opačně – jako inhibitor transkripce. E4BP4 se váže na stejné vazebné místo promotoru *Per1* jako DBP. Produkce E4BP4 a DBP osciluje v opačné fázi (Mitsui et al., 2001).

## 3 Postranskriční modifikace

microRNAs (miRNAs) jsou nekódující úseky RNA, které se na základě komplementarity bází váží na 3'UTR oblast mRNA a inhibují tak translaci daného genu. Vazbou miRNA na mRNA se vytváří RISC komplex, RNA je rozštěpena a degradována. Usuzuje se, že vazba miRNA je důležitým regulačním krokem, který vysvětluje zpoždění translace *Per* oproti jeho transkripci. Při ztrátě této regulace dochází ke zkracování periody hodin, z důvodu akumulace *Per* v cytoplazmě. Konkrétně se jedná o miR-24, miR-29a a miR-30a (Chen et al., 2013).

Další důležitou postranskriční modifikací je metylace RNA, konkrétně <sup>6</sup>adenosinu. Metylační místa nacházíme na mRNA genů *Per1*, *2* a *3*, *Dpb*, *Nr1d1* (*Rev-erb*) a *Nr1d2* (*Ror*) a to blízko 3' konce. Ztráta metylační funkce vede v periferních oscilátorech k prodloužení periody hodin (Fustin et al., 2013).

## 4 Postranlační modifikace

Nejvýznamnějšími postranlačními modifikacemi jsou fosforylace, acetylce, sumoylace a ubiquitinace. Tyto modifikace slouží hlavě jako regulační mechanismus chodu hodin. Ovlivňují periodu a fázi hodin a podílejí se na resetování hodin.

### 4.1.1 Fosforylace

CLOCK i BMAL1 jsou rytmicky, či v reakci na podnět, fosforylovány. Fosforylace vede ke změně stability, lokalizace i funkce. Fosforylace Ser17 a Thr21 BMAL1 GSK3- $\beta$  kinázou slouží jako destabilizační signál a signál pro ubiquitinaci (Sahar et al., 2010). Ubiquitinace BMAL1 je zprostředkována UBE3A ubiquitin ligázou. Ztráta funkce UBE3A vede k prodloužení periody cirkadiánních rytmů (Gossan et al., 2014). Obdobně funguje i fosforylace Ser38, Ser42 a Ser427 přes CIPC protein, který svou vazbou na CIPC-vazebnou doménu CLOCK umožní vazbu kináz, obdobně jako PER u *Drosophila melanogaster*. Fosforylovaný CLOCK je určený k degradaci (Yoshitane et al., 2009). Fosforylace Ser90 BMAL1 kinázou CK1 $\alpha$  a fosforylace CLOCK protein kinázou C (PKC) slouží jako lokalizační signál do jádra. Tato fosforylace se podílí na resetování hodin (Shim et al., 2007; Tamaru et al., 2009). MAPK kináza fosforyluje Thr534 BMAL1, což vede k inhibici transkripční funkce dimeru CLOCK-BMAL1. Fosforylace způsobuje konformační změnu na C-terminální aktivační doméně (Sanada et al., 2002). Fosforylace BMAL1 prostřednictvím CK1 $\epsilon$  vede ke zvýšení transkripční funkce. Vazba je zde přímá, oproti PER a CRY, které tato kináza také fosforyluje, zde nevzniká ternární komplex (Eide et al., 2002).

Fosforylace PER je jednou z nejdůležitějších postranlačních modifikací, která umožňuje vstup PER do jádra anebo jeho degradaci. Tzv. *tau* mutace (Ralph and Menaker, 1988) u syrského křečka, která zkracuje periodu u heterozygota na 22 hodin a u homozygota na 20 hodin, vedla k objevu regulační funkce CK1 $\epsilon$ . Gen kódující tuto kinázu se nachází na lokusu *tau* (Lowrey, 2000) a záměna Cys za Thr vede k „gain of function“ mutaci a hyperfosforylaci PER (Meng et al., 2008). Hyperfosforylovaný PER je rychle degradován už na počátku subjektivní noci, což vede ke zkrácení periody hodin. Pouze fosforylovaný PER v komplexu s CRY je schopný vstupovat do jádra. Na této fosforylaci se právě podílí CK1 $\epsilon$ , která je zároveň schopna v komplexu CK1 $\epsilon$ -PER-CRY fosforylovat CRY (Eide et al., 2002). Na fosforylaci se vyjma CK1 $\epsilon$  podílí i homologní CK1 $\delta$  (Camacho et al., 2001). Vanselow et al. (2006) detekoval celkem 21 míst, která jsou u PER fosforylována. Osud

proteinu závisí na tom, které místo bude fosforylováno. Konkrétně fosforylace Ser659 CK1 $\epsilon$  vede k jaderné lokalizaci tohoto proteinu (Vanselow et al., 2006). Fosforylací Thr121, Ser122 a Ser126 CK1 proteinu PER, který není svázán s CRY, je umožněna vazba  $\beta$ -TRCP1 a 2, které se vážou na motiv TSGCSS a jsou rozpoznávány SCF E3 ubiquitin ligázou. Ubiquitinová značka je pak rozeznávána proteozomálním aparátem a PER je degradován (Shirogane et al., 2005). Obdobným způsobem je degradován CRY. SCF E3 ubiquitin ligáza rozeznává FBXL3 a FBXL21, které jsou stejně jako  $\beta$ -TRCP1 a 2 členy rodiny F-box vazebných proteinů s repeticemi bohatými na leucin (Winston et al., 1999). Právě tyto repetice umožňují vazbu se substrátem. FBXL21, analog FBXL3, funguje jako částečný agonista, který svou vazbou znemožňuje rychlou degradaci, kterou způsobuje FBXL3. FBXL3 nacházíme zásadně v jádře, kdežto FBXL21 i v cytoplasmě (Yoo et al., 2013). Stejně jako PER je i CRY při procesu degradace fosforylován. Fosforylace AMPK kinázou na Ser71 a Ser280 zvyšuje schopnost vazby FBXL3, a naopak snižuje vazbu s PER (Lamia et al., 2009). FBXL se váže do FAD vazebné kapsy, mutace CRY2 A260T (záměna alaninu 260 za threonin) vede k vyšší přístupnosti tohoto vazebného místa, a tudíž k rychlejší degradaci CRY. Tato mutace je spojována se syndromem FASPS (Hirano et al., 2016). U jedinců s FASP syndromem pozorujeme navíc záměnu Ser662 (Toh, 2001) nebo Ser659 (Vanselow et al., 2006) za Gly ve vazebném místě pro CK1 $\epsilon$  u PER a missense mutaci CK1 $\delta$ , kdy dochází k záměně Thr44 za Ala, což vede ke snížené enzymatické aktivitě kinázy, hypofosforylaci PER a zkrácení periody (Xu et al., 2005).

Fosforylace nukleárního receptoru REV-ERB $\alpha$  GSK3- $\beta$  kinázou vede ke stabilitě tohoto receptoru (Yin, 2006).

#### 4.1.2 Acetylce a deacetylce

CLOCK je schopný acetylovat svého vazebného partnera BMAL1. Jedná se o acetylaci Lys537, pro kterou je nutná tvorba dimeru CLOCK-BMAL1. Je to esenciální modifikace, která umožňuje vazbu s CRY vedoucí k inhibici transaktivací funkce dimeru (Hirayama et al., 2007).

O-GlcNAc transferáza (OGT) acetyluje Ser662 a Ser671 PER2, které jsou zároveň cílem fosforylace. Má se za to, že zde acetylce funguje jako antagonist fosforylace. Inhibice acetylce vede ke zkrácení periody, a naopak inhibice deacetylce k prodloužení (Kaasik et al., 2013). OGT acetyluje i BMAL1 a CLOCK, což vede k inhibici ubiquitinace. Transaktivací schopnost je tedy acetylací OGT posílena (Li et al., 2013).

SIRT1  $\text{NAD}^+$  dependentní deacetyláza je schopná vazby na komplex CLOCK-BMAL1-PER a deacetylovat PER (Asher et al., 2008). Acetylace u PER probíhá na stejných lysinových motivech jako ubiquitinace, acylací je znemožněna vazba ubiquitinu a degradace PER. Při mutaci SIRT1 dochází k inhibici lysinových míst pro ubiquitinaci acylací, což vede k nadměrné akumulaci PER (Asher et al., 2008). SIRT1 hraje roli také v deacetylaci Lys537 BMAL1, který je acetylován CLOCK. Navíc dokáže s dimerem CLOCK-BMAL1 vytvářet chromatin modifikující komplex (Nakahata et al., 2008). Samotný SIRT1 totiž není schopný vazby na DNA. Ovlivňuje takto např. *Dbp*. SIRT1 deacetyláza deacetyluje MML1 metyltransferázu, která asociuje s komplexem transkripčních aktivátorů a CLOCK-BMAL1, což vede ke snížení enzymatické aktivity (Aguilar-Arnal et al., 2015).

#### 4.1.3 Další postranlační modifikace

BMAL1 je SUMO2/3 polysumoylován, což je signál pro ubiquitinaci. Sumoylace probíhá na Lys259 a umožňuje akumulaci BMAL1 v jádře. Ačkoliv vede sumoylace k ubiquitinaci a ta k degradaci, sumoylovaný BMAL1 v dimeru s CLOCK vykazuje posílenou transkripční funkci (Lee et al., 2008).

$\text{NAD}^+$  dependentní PARP-1 ADP ribosyltransferáza zprostředkovává poly(ADP-ribosyl)aci CLOCK. Tato modifikace se podílí na seřizování (entrainment) periferních oscilátorů a je závislá na příjmu potravy. Aktivita PARP-1 je v době příjmu potravy utlumena. Deficit v poly(ADP-ribosyl)aci vede ke zvýšení DNA-vazebné funkce dimeru CLOCK-BMAL1, což vede k větší transkripční aktivitě inhibitorů tohoto dimeru (Asher et al., 2010).

DDB1-CUL4 ubiquitin ligáza v komplexu s CLOCK-BMAL1 modifikuje E-box promotoru genu *Per*. Po nasednutí komplexu CLOCK-BMAL1 s ubiquitin ligázou dochází k mono-ubiquitinaci histonu H2B, což vede k modifikaci chromatinu, která zamezuje vazbě dalších specifických efektorových proteinů, které by dále mohli chromatin modifikovat a ovlivňovat transkripci *Per*. Usuzuje se, že PER, který funguje jako inhibitor vlastní transkripce, rozeznává jak dimer CLOCK-BMAL1, tak i mono-ubiquitinovaný H2B v oblasti vlastního promotoru (Tamayo et al., 2015).

ARF-BP1 a PAM E3 ubiquitin ligázy se podílejí na degradaci REV-ERB $\alpha$ . Přítomnost obou ligáz je nutná v definovaném poměru pro ubiquitinaci tohoto nukleárního receptoru. Nepřítomnost těchto ligáz vede ke snížení hladiny exprese *Bmal1*, což negativně ovlivňuje *Cry1* a *Per2* (Yin et al., 2010).

## 5 Neuropsychiatrické choroby

Mezinárodní asociace neuropsychiatrických chorob definuje tyto choroby jako kognitivní onemocnění (demence a predementní syndromy), nedementní kognitivní onemocnění, záchvatová onemocnění, poruchy pohybu, traumatická poranění mozku, sekundární psychiatrická onemocnění (psychózy, deprese, mánie a úzkosti) a poruchy pozornosti a spánku (shrnutí v Miyoshi and Morimura, 2010).

Neuropsychiatrická onemocnění můžeme v souvislosti s cirkadiánními rytmy rozdělit na ty, které jsou či nejsou spojené s poruchou spánku. Spánek je jedním z hlavních procesů, který je hodinovým mechanismem řízen. Na cyklu spánku a bdění nemají vliv pouze hodiny, ale především homeostatická regulace (shrnutí v Huang et al., 2011).

U zdravých jedinců bez neuropsychiatrického onemocnění pozorujeme tzv. chronotypy. Chronotypem rozumíme nastavení fáze cirkadiánních rytmů během 24 hodin, vedoucí k preferenci v načasování různých činností, např. doby uléhání ke spánku na určitou denní dobu (Roenneberg et al., 2003). Tyto projevy se u jednotlivců liší. Extrémní chronotypy označujeme jako časný chronotyp (ranní ptáče), jehož subjektivní noc začíná brzy z večera a končí brzy ráno, a pozdní chronotypy (noční sova), jehož subjektivní noc začíná později večer a spánek trvá do pozdních ranních či odpoledních hodin (shrnutí v Vitale et al., 2015). U jedinců s neuropsychiatrickými poruchami pozorujeme časté abnormality v začátku a konci subjektivní noci. U depresí (Roane and Taylor, 2008) a úzkostí (Neckelmann et al., 2007) byl narušený spánek dokonce označen jako rizikový faktor vzniku těchto onemocnění. Spánek má také úzkou spojitost s dalšími chorobami, např. s metabolickými syndromy (Maury et al., 2010), obezitou (Froy, 2010), diabetem (Nagorny and Lyssenko, 2012) nebo rakovinou (Savvidis and Koutsilieris, 2012) (shrnutí v Liu and Chung, 2015).



Definovat molekulární podstatu některých neuropsychiatrických onemocnění je velmi obtížné. Propojení těchto chorob s cirkadiánním systémem není výjimkou. Souvislost cirkadiánního systému s neuropsychiatrickými poruchami byla prokázána u některých mutací v hodinových genech, které se fenotypicky projevují například úzkostmi, nebo stavy mánie (Roybal et al., 2007; Spencer et al., 2013). Příkladem jsou mutace v genech centrální smyčky *Per1* a *Per2*, které se projevují chováním připomínajícím úzkosti. Mutace pouze v jednom z těchto genů toto chování nevykazuje, což naznačuje, že mezi nimi dochází k jisté kompenzaci funkce. Jedná se hlavně o geny *Per1* a *Per2* exprimované v oblasti *nucleus accumbens* (Spencer et al., 2013). Oproti tomu mutace *Clock* jsou spojeny spíše s bipolární poruchou. Jedinci s touto mutací jsou hyperaktivní, objevují se u nich stavy mánie střídající se s depresemi a jsou senzitivnější k vlivu psychostimulantů (Roybal et al., 2007).

Jak bylo zmíněno výše (kapitola 2.2), některé hodinové geny působí jako transkripční faktory a ovlivňují jiné geny mimo hodinový mechanismus. Příkladem je *Rev-erba*, který kóduje nukleární receptor ovlivňující produkci dopaminu, důležité molekuly hrající roli u bipolárních poruch. Delece v *Rev-erba* ve ventrální části středního mozku vedoucí k inaktivaci tohoto nukleárního receptoru, způsobila, že tyrosin hydroxyláza, enzym, který se podílí na tvorbě dopaminu, není inhibován a produkce dopaminu je vyšší než u jedinců bez této mutace (Chung et al., 2014). Jedinci s touto mutací jsou emocionálně nestabilní, agresivní, hyperaktivní, projevuje se u nich rizikové chování (tzv. „higher risk-taking“ behaviour), což označujeme jako projevy mánie. REV-ERB $\alpha$  kompetuje o vazebné místo s NURR1, což je další nukleární receptor, který produkci tyrosin hydroxylázy naopak aktivuje (shrnutí v Chung et al., 2014).

Předmětem zájmu se stává i studium vlivu léčiv, které se k léčbě neuropsychiatrických onemocnění používají, na cirkadiánní systém. Například antidepressivum ketamin působí na dimer CLOCK-BMAL1 a inhibuje jeho transkripční funkci (Bellet et al., 2011) a to v závislosti na přítomnosti kinázy GSK3- $\beta$  (Bellet et al., 2011). Ukázalo se však, že tato jeho inhibiční schopnost je závislá na dávce. Bylo ji možno vyvolat jen s využitím vyšších dávek, než se používají při léčbě pacientů (Bellet et al., 2011).

V této práci bude dále pozornost věnována několika vybraným příkladům prokázané souvislosti mezi cirkadiánním systémem s některými typy onemocnění autistického spektra.

## 5.1 Onemocnění autistického spektra (ASD)

Onemocnění autistického spektra je charakterizováno poruchou komunikace, opakujícím se stereotypním chováním a neobvyklými reakcemi na smyslové podněty. Toto pro ASD typické chování je nezávislé na etniku, kultuře a socio-ekonomickém zařazení. U jedinců s tímto onemocněním se často toto chování liší nejen závažností, ale mnohdy je doprovázeno i dalším onemocněním např. ADHD. Často se v literatuře uvádí, že soubor onemocnění autistického spektra tvoří autismus, pervazivní vývojové poruchy dále nespecifikované a Aspergerův syndrom (shrnutí v Lord et al., 2018).

Onemocnění autistického spektra lze rozlišit na syndromatické a ne-syndromatické (Benvenuto et al., 2009; Lintas and Persico, 2008). U ne-syndromatické formy se uvádí autismus jako primární diagnóza. Je způsoben často neznámým genetickým, enviromentálním, či multifaktoriálním vlivem. Mnohdy je tato forma spojována s geny, které se podílejí na vzniku ne-syndromatických intelektuálních vad a epilepsii. Oproti tomu syndromatická forma je definována dobře geneticky definovatelným syndromem, který doprovází pro autismus typické chování. Jedná se o např. o tuberózní sklerózu, Rettův syndrom, syndrom fragilního X chromozomu, a podobně. Oproti ne-syndromatické formě pozorujeme rozdíl ve výskytu v populaci mezi pohlavími (shrnutí v Ivanov et al., 2015). Genetickou podstatu a projev autistického chování u vybraných syndromů ukazuje tabulka 1.

<b>syndrom</b>	<b>gen(y)/oblasti chromozomů spojeny s tímto syndromem</b>	<b>autistické chování</b>
syndrom fragilního X chromozomu	FMR1	slabý oční kontakt, sociální úzkost, stereotypní chování, vada řeči
tuberózní skleróza	TSC1, TSC2	problémy s učení a chováním
Rettův syndrom	MECP2	stereotypní chování, vada řeči, problémy se sociálními interakcemi, ztráta očního kontaktu
Prader-Williho syndrom	Delece paternální alely 15q11-q13	opakující se chování, problémy s interakcemi se společností
Angelmanův syndrom	Delece/mutace maternální UBE3A	problémy s řečí, stereotypní chování
Smith-Magenis syndrom	Delece 17p11.2	stereotypní chování, často sebepoškozování

**Tabulka 1:** Vybrané syndromy spojované s onemocněním autistického spektra, jejich genetická podstata a znaky autistického chování (převzato z práce Ivanov et al., 2015).

## 5.2 Vztah cirkadiánního systému s ASD

Nejlépe pozorovatelnou souvislostí cirkadiánního systému s ASD je porucha spánku. Studie ukazují, že 40-80 % dětí s ASD (Richdale, 1999) trpí jistou mírou poruchy spánku, oproti tomu pouze 25-40 % dětí bez ASD má obdobné problémy (Mindell and Meltzer, 2008). Častěji těmito poruchami trpí děti s tzv. „low functioning“ autismem, ten je definován nižším intelektuálním koeficientem, než je průměr populace. Tyto problémy pak prohlubují samotné symptomy ASD – častěji se u těchto jedinců vyskytují záchvaty vzteku a obecně je jejich chování agresivnější. U ASD jedinců nacházíme primární spánkové poruchy, které jsou definovány mezinárodní klasifikací spánkových chorob jako insomnie, parasomnie a poruchy cirkadiánních rytmů určujících spánek a bdělost (shrnutí v Cohen et al., 2014).

### 5.2.1 SHANK3 ovlivňuje transkripci hodinových genů

SHANK3 se společně s neuroliginy podílí na tvorbě synaptické sítě, funguje jako tzv. „scaffold“ protein při vazbě neuronů. Studie ukazují, že delece v genech *Nlgn3* a *Nlgn4* kódujících neuroliginy jsou často spojeny s autismem a Aspergerovým syndromem (Jamain et al., 2003), který označujeme jako lehčí formu autistického onemocnění. Jedinci s tímto syndromem mají obvykle oproti jiným typům autistického onemocnění větší kognitivní schopnosti (Durand et al., 2007).

Mutace chromozomu 22q13.3, na kterém se nachází i gen kódující SHANK3 vedou k poruše řeči a problémy s komunikací obecně. Tato mutace je spojována s autistickým onemocněním (Soorya et al., 2013) a s Phelan-McDemid syndromem (PMS) (Phelan and McDermid, 2012).

Studie ukazují, že 1 z 59 dětí v USA (“Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014,” n.d.) je diagnostikováno s onemocněním autistického spektra a celkem 40-80 % takto diagnostikovaných jedinců trpí jistou poruchou spánku. Toto zjištění nasvědčuje spojitosti mezi cirkadiánním systémem a ASD. Ve většině případech se jedná hlavně o problémy s usnutím a opakovaným probouzením během spánku. Delece 22q13.3 spojená právě s autismem a PMS se kromě intelektuální nestability, problémy s komunikací a motorikou, projevuje problémy s usínáním a udržím spánkové fáze již od 5 roka života. Tyto problémy se mohou během života zlepšovat, ale často se vyskytne nějaká forma parasomnie, například náměsíčnost. Takovéto problémy často komplikují symptomy způsobené samotným ASD (Bro et al., 2017).

Delece exonu 21 *Shank3* (Ingiosi et al., 2019) způsobuje snížení hladiny exprese hodinových genů, konkrétně *Per3*, *Hlf*, *Tef*, *Rev-erba* a *Dec2*, avšak na hladinu cirkadiánních rytmů řízených SCN vliv nemá. Usuzuje se tedy, že vliv je spíše na úrovni periferních hodin (Ingiosi et al., 2019).

Jsou zvažovány dva mechanismy, jakými tato mutace ovlivňuje hladinu exprese hodinových genů. První předpokládá vliv na Wnt signální kaskádu, která ovlivňuje GSK3- $\beta$ , tj. enzym, který, jak bylo zmíněno v kapitole 3.1.1., hraje důležitou regulační roli v expresi hodinových genů. SHANK3 ovlivňuje receptor Frizzled-2 (Harris et al., 2016) a jadernou lokalizaci ligandu beta-catenin (Qin et al., 2018). Avšak ovlivnění funkce GSK3- $\beta$  moduluje periodu, což u jedinců s mutací *Shank3* nebylo pozorováno. Pravděpodobnější je proto druhá

možnost. SHANK3 je schopný vstupovat do jádra, interagovat s jadernými ribonukleoproteiny a komponenty komplexu RNA poly II a tím ovlivňovat transkripci. Mutace tedy nejspíše vede k deficitu na úrovni této regulační funkce, která nejspíše ovlivňuje transkripci hodinových genů (Ingiosi et al., 2019).

### 5.2.2 UBE3A mutace způsobuje Angelmanův syndrom

U jedinců s Angelmanovým syndromem je častá krátká délka spánku a značné zpoždění v době nástupu ospalosti. Obecně je Angelmanův syndrom (Laan et al., 1999) charakterizován mentálními problémy, problémy s motorikou, epileptickými záchvaty a vývojovým opožděním. Angelmanův syndrom je způsoben delecí 15q11-q13 mateřského chromozomu, přičemž otcovský chromozom je umlčen (imprinting) (Pembrey et al., 1989). Na tomto chromozomu se nachází i gen pro UBE3A ubiquitin ligázu, která hraje roli při degradaci BMAL1 (Sutcliffe et al., 1997).

Jak již bylo výše zmíněno (kapitola 3.1.1), UBE3A ligáza hraje roli v degradaci BMAL1. Avšak i BMAL1 je schopný ovlivňovat UBE3A. *Ube3a* má v oblasti promotoru E-box, na který se váže BMAL1, a takto ovlivňuje expresi tohoto genu. Nicméně exprese genu nevykazuje obdobnou oscilaci jako u hodinových genů, které BMAL1 také ovlivňuje (Shi et al., 2015). Mutací v genu pro UBE3A dochází k prodloužení periody vlivem neschopnosti vázat ubiquitin na BMAL1 a tím ho označit k degradaci (Gossan et al., 2014). Delší perioda se projevuje ve zpoždění fáze hodin, což často vede ke vzniku syndromu opoždění fáze spánku – delayed sleep phase syndrome (DSPS), který se projevuje pozdějším usínáním a vstáváním. Pozdější nástup spánku pozorujeme i u pacientů s Angelmanovým syndromem (Shi et al., 2015).

### 5.2.3 Cloud lncRNA 116HG působí jako transkripční faktor na hodinové geny u Prader-Williho syndromu

Jedinci s Prader-Williho syndromem (PWS) jsou obézní, projevuje se u nich intelektuální nestabilita, abnormality ve spánku (konkrétně pozdější usínání, kratší doba spánku a denní ospalost) a někteří jedinci mohou trpět psychózami a chováním autistického spektra. Jeho příčinou je ztráta nekódující RNA paternálního chromozomu 15q11-q13, konkrétně se jedná o delecii. Maternální chromozom je umlčený (Ledbetter et al., 1981). Lokus PWS genu se nachází v klastru nekódujících RNA oblastí HBII-85/SNORD116. SNORD116 region kóduje C/D box malé jaderné RNA (snoRNAs) a dlouhý nekódující úsek genu *116HG*, který je sestříhován (lncRNA *116HG*). 116HG cloud je schopný vazby na

RBBP5 podjednotku MLL1 komplexu, který metylací Lys4 histonu H3 aktivuje transkripci. Ukázalo se, že jedním z genů, které je 116HG takto schopný ovlivňovat je *mTor*. Hladina mTOR proteinu byla vyšší v myších s deletovanou oblastí *116HG*. Vazba 116HG na RBBP5 totiž znemožňuje vazbu aktivačního komplexu na promotor (Powell et al., 2013). mTOR se podílí na regulaci metabolismu a je exprimován v mozkové kůře v cirkadiálním rytmu. Tato spojitost vedla k objevu vazby mezi 116HG a cirkadiálními geny. V myších s deletovaným *116HG* byla hladina exprese *Cry1*, *Clock* a *Per2* vyšší během světelné fáze dne (Powell et al., 2013).

## 6 Závěr

Jak tato práce ukazuje, molekulární mechanismus řízení cirkadiálních rytmů je komplexní sítí propojující regulační mechanismy hodinových genů a jejich postranskripčních a postranlačních modifikací. Ačkoliv se tato práce zabývala těmito mechanismy podrobněji, nemohla obsáhnout všechny spojitosti těchto mechanismů v celé jejich komplexnosti. Základem hodinového mechanismu jsou proteiny genů *Clock* a *Bmal1* tvořící pozitivní část hlavní zpětnovazebné transkripčně-translační smyčky. Aktivují transkripci genů *Per* a *Cry*, které jsou součástí negativní části této smyčky a hodinami kontrolovaných genů. Proteiny PER a CRY působením na dimer CLOCK-BMAL1 inhibují jeho transaktivační funkci, a tak i svoji transkripci. Obdobnou funkci jako *Clock* má i jeho homolog *Npas2*. Geny mimo hlavní smyčku – *Chrono*, *Tim*, *Rev-erb*, *Ror*, *Dec1*, *Dec2*, *Nfil3* a *Dbp* se podílejí na její regulaci. *Chrono* inhibuje transaktivační funkci dimeru CLOCK-BMAL1. *Tim* destabilizuje svou vazbou dimer PER-CRY. Jaderné receptory REV-ERB a ROR se podílejí na regulaci *Bmal1*. Kromě toho se podílejí i na regulaci *Cry1* a *Npas2*. *Dec1* a *Dec2* fungují jako regulátory transkripce *Per1*. *Dbp* rodiny PAR bZip transkripčních faktorů ko-aktivuje transkripci *Per*, oproti tomu v opačné fázi exprimovaný *Nfil3* funguje jako inhibitor transkripce. Další úrovní regulace jsou postranskripční modifikace. Zde hrají roli miRNAs, které opožďují translaci *Per* mRNA a methylace RNA. Fosforylace, acetylce, sumoylace, ubiquitinace a další postranlační modifikace hodinových genů se podílí na jejich jaderné lokalizaci, degradaci a funkci. Fosforylace PER a CRY je důležitá jak pro jejich jadernou lokalizaci, tak degradaci. Acetylce dimeru CLOCK-BMAL1 podporuje transaktivační funkci.

U jedinců s onemocněním autistického spektra se v 40-80 % vyskytují problémy se spánkem. Mutace v *Shank3* a ztráta nekódující RNA, hrající roli při vzniku ASD a syndromů s ASD spjatých, ovlivňují expresi hodinových genů, oproti tomu mutace jedné z komponent hodinového systému, UBE3A ligázy, způsobuje Angelmanův syndrom. ASD je těžko geneticky definovatelné multigenetické onemocnění u kterého by další studie souvislostí s cirkadiálním systémem mohli vést k bližšímu porozumění genetické podstaty.

## 7 Bibliografie

- Aguilar-Arnal, L., Katada, S., Orozco-Solis, R., Sassone-Corsi, P., 2015. NAD<sup>+</sup>-SIRT1 control of H3K4 trimethylation through circadian deacetylation of MLL1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 312–318. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2990>
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., Nishida, E., 2002. Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I  $\epsilon$  (CKI $\epsilon$ ) and CKI $\delta$  in Cultured Cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1693–1703. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.6.1693-1703.2002>
- Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., Schibler, U., 2008. SIRT1 Regulates Circadian Clock Gene Expression through PER2 Deacetylation. *Cell* 134, 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.050>
- Asher, G., Reinke, H., Altmeyer, M., Gutierrez-Arcelus, M., Hottiger, M.O., Schibler, U., 2010. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Participates in the Phase Entrainment of Circadian Clocks to Feeding. *Cell* 142, 943–953. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.016>
- Axelrod, J., 1974. The Pineal Gland: A Neurochemical Transducer. *Science* 184, 1341–1348. <https://doi.org/10.1126/science.184.4144.1341>
- Balsalobre, A., 2000. Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling. *Science* 289, 2344–2347. <https://doi.org/10.1126/science.289.5488.2344>
- Balsalobre, A., Damiola, F., Schibler, U., 1998. A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. *Cell* 93, 929–937. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81199-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81199-x)
- Bartness, T.J., Goldman, B.D., 1989. Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. *Experientia* 45, 939–945. <https://doi.org/10.1007/BF01953051>
- Bellet, M.M., Vawter, M.P., Bunney, B.G., Bunney, W.E., Sassone-Corsi, P., 2011. Ketamine Influences CLOCK:BMAL1 Function Leading to Altered Circadian Gene Expression. *PLoS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023982>
- Benvenuto, A., Moavero, R., Alessandrelli, R., Manzi, B., Curatolo, P., 2009. Syndromic autism: causes and pathogenetic pathways. *World J. Pediatr.* 5, 169–176. <https://doi.org/10.1007/s12519-009-0033-2>
- Berson, D.M., 2002. Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science* 295, 1070–1073. <https://doi.org/10.1126/science.1067262>
- Bro, D., O'Hara, R., Primeau, M., Hanson-Kahn, A., Hallmayer, J., Bernstein, J.A., 2017. Sleep Disturbances in Individuals With Phelan-McDermid Syndrome: Correlation With Caregivers' Sleep Quality and Daytime Functioning. *Sleep* 40. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsw062>
- Brown, S.A., 2005. PERIOD1-Associated Proteins Modulate the Negative Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Science* 308, 693–696. <https://doi.org/10.1126/science.1107373>
- Buhr, E.D., Yoo, S.-H., Takahashi, J.S., 2010. Temperature as a Universal Resetting Cue for Mammalian Circadian Oscillators. *Science* 330, 379–385. <https://doi.org/10.1126/science.1195262>
- Camacho, F., Cilio, M., Guo, Y., Virshup, D.M., Patel, K., Khorkova, O., Styren, S., Morse, B., Yao, Z., Keesler, G.A., 2001. Human casein kinase I $\delta$  phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. *FEBS Lett.* 489, 159–165. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02434-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02434-0)



- Chen, R., D'Alessandro, M., Lee, C., 2013. miRNAs Are Required for Generating a Time Delay Critical for the Circadian Oscillator. *Curr. Biol.* 23, 1959–1968. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.005>
- Chung, S., Eun, Yun, S., Han, Park, S.-B., Hyo, Kim, K.-S., Dean, Lee, I., Hwang, O., Gi, Kim, K., 2014. Impact of Circadian Nuclear Receptor REV-ERB $\alpha$  on Midbrain Dopamine Production and Mood Regulation. *Cell* 157, 858–868. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.039>
- Cohen, S., Conduit, R., Lockley, S.W., Rajaratnam, S.M., Cornish, K.M., 2014. The relationship between sleep and behavior in autism spectrum disorder (ASD): a review. *J. Neurodev. Disord.* 6, 44. <https://doi.org/10.1186/1866-1955-6-44>
- Cox, K.H., Takahashi, J.S., 2019. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *J. Mol. Endocrinol.* 63, R93–R102. <https://doi.org/10.1530/jme-19-0153>
- Crumbley, C., Wang, Y., Kojetin, D.J., Burris, T.P., 2010. Characterization of the Core Mammalian Clock Component, NPAS2, as a REV-ERB $\alpha$ /ROR $\alpha$  Target Gene. *J. Biol. Chem.* 285, 35386–35392. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.129288>
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., Schibler, U., 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14, 2950–2961.
- Deutsch, P.J., Hoeffler, J.P., Jameson, J.L., Habener, J.F., 1988. Cyclic AMP and phorbol ester-stimulated transcription mediated by similar DNA elements that bind distinct proteins. 85, 7922–7926. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.21.7922>
- Dibner, C., Schibler, U., Albrecht, U., 2010. The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 517–549. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135821>
- Ditacchio, L., Le, H.D., Vollmers, C., Hatori, M., Witcher, M., Secombe, J., Panda, S., 2011. Histone Lysine Demethylase JARID1a Activates CLOCK-BMAL1 and Influences the Circadian Clock. *Science* 333, 1881–1885. <https://doi.org/10.1126/science.1206022>
- Doi, M., Hirayama, J., Sassone-Corsi, P., 2006. Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase. *Cell* 125, 497–508. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.033>
- Drolet, D.W., Scully, K.M., Simmons, D.M., Wegner, M., Chu, K.T., Swanson, L.W., Rosenfeld, M.G., 1991. TEF, a transcription factor expressed specifically in the anterior pituitary during embryogenesis, defines a new class of leucine zipper proteins. *Genes Dev.* 5, 1739–1753. <https://doi.org/10.1101/gad.5.10.1739>
- Duong, H.A., Robles, M.S., Knutti, D., Weitz, C.J., 2011. A molecular mechanism for circadian clock negative feedback. *Science* 332, 1436–1439. <https://doi.org/10.1126/science.1196766>
- Duong, H.A., Weitz, C.J., 2014. Temporal orchestration of repressive chromatin modifiers by circadian clock Period complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 126–132. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2746>
- Durand, C.M., Betancur, C., Boeckers, T.M., Bockmann, J., Chaste, P., Fauchereau, F., Nygren, G., Rastam, M., Gillberg, I.C., Anckarsäter, H., Sponheim, E., Goubran-Botros, H., Delorme, R., Chabane, N., Mouren-Simeoni, M.-C., de Mas, P., Bieth, E., Rogé, B., Héron, D., Burglen, L., Gillberg, C., Leboyer, M., Bourgeron, T., 2007. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.* 39, 25–27. <https://doi.org/10.1038/ng1933>

- Eide, E.J., Vielhaber, E.L., Hinz, W.A., Virshup, D.M., 2002. The Circadian Regulatory Proteins BMAL1 and Cryptochromes Are Substrates of Casein Kinase I. *J. Biol. Chem.* 277, 17248–17254. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111466200>
- Engelen, E., Janssens, R.C., Yagita, K., Smits, V.A.J., Van Der Horst, G.T.J., Tamanini, F., 2013. Mammalian TIMELESS Is Involved in Period Determination and DNA Damage-Dependent Phase Advancing of the Circadian Clock. *PLoS ONE* 8, e56623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056623>
- Etchegaray, J.-P., Lee, C., Wade, P.A., Reppert, S.M., 2003. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* 421, 177–182. <https://doi.org/10.1038/nature01314>
- Etchegaray, J.-P., Yang, X., DeBruyne, J.P., Peters, A.H.F.M., Weaver, D.R., Jenuwein, T., Reppert, S.M., 2006. The polycomb group protein EZH2 is required for mammalian circadian clock function. *J. Biol. Chem.* 281, 21209–21215. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603722200>
- Froy, O., 2010. Metabolism and Circadian Rhythms—Implications for Obesity. *Endocr. Rev.* 31, 1–24. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0014>
- Fustin, J.-M., Doi, M., Yamaguchi, Y., Hida, H., Nishimura, S., Yoshida, M., Isagawa, T., Morioka, M.S., Kakeya, H., Manabe, I., Okamura, H., 2013. RNA-Methylation-Dependent RNA Processing Controls the Speed of the Circadian Clock. *Cell* 155, 793–806. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.026>
- Gekakis, N., 1998. Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. *Science* 280, 1564–1569. <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1564>
- Gonzalez, G.A., Montminy, M.R., 1989. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675–680. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90013-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90013-5)
- Goriki, A., Hatanaka, F., Myung, J., Kim, J.K., Yoritaka, T., Tanoue, S., Abe, T., Kiyonari, H., Fujimoto, K., Kato, Y., Todo, T., Matsubara, A., Forger, D., Takumi, T., 2014. A Novel Protein, CHRONO, Functions as a Core Component of the Mammalian Circadian Clock. *PLoS Biol.* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001839>
- Gossan, N.C., Zhang, F., Guo, B., Jin, D., Yoshitane, H., Yao, A., Glossop, N., Zhang, Y.Q., Fukada, Y., Meng, Q.-J., 2014. The E3 ubiquitin ligase UBE3A is an integral component of the molecular circadian clock through regulating the BMAL1 transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 42, 5765–5775. <https://doi.org/10.1093/nar/gku225>
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., Cermakian, N., 2005. Differential Control of Bmal1 Circadian Transcription by REV-ERB and ROR Nuclear Receptors. *J. Biol. Rhythms* 20, 391–403. <https://doi.org/10.1177/0748730405277232>
- Habener, J.F., 1990. MINIREVIEW: Cyclic AMP Response Element Binding Proteins: A Cornucopia of Transcription Factors. *Mol. Endocrinol.* 4, 1087–1094. <https://doi.org/10.1210/mend-4-8-1087>
- Harris, K.P., Akbergenova, Y., Cho, R.W., Baas-Thomas, M.S., Littleton, J.T., 2016. Shank Modulates Postsynaptic Wnt Signaling to Regulate Synaptic Development. *J. Neurosci.* 36, 5820–5832. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4279-15.2016>
- Hattar, S., Liao, H.-W., Takao, M., Berson, D.M., Yau, K.-W., 2002. Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity. *Science* 295, 1065–1070. <https://doi.org/10.1126/science.1069609>
- Hirano, A., Shi, G., Jones, C.R., Lipzen, A., Pennacchio, L.A., Xu, Y., Hallows, W.C., McMahon, T., Yamazaki, M., Ptáček, L.J., Fu, Y.-H., 2016. A Cryptochrome 2 mutation yields advanced sleep phase in humans. *eLife* 5, e16695. <https://doi.org/10.7554/eLife.16695>

- Hirayama, J., Sahar, S., Grimaldi, B., Tamaru, T., Takamatsu, K., Nakahata, Y., Sassone-Corsi, P., 2007. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* 450, 1086–1090. <https://doi.org/10.1038/nature06394>
- Hogenesch, J.B., Gu, Y.-Z., Jain, S., Bradfield, C.A., 1998. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 5474–5479. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5474>
- Honma, S., Kawamoto, T., Takagi, Y., Fujimoto, K., Sato, F., Noshiro, M., Kato, Y., Honma, K.-I., 2002. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 419, 841–844. <https://doi.org/10.1038/nature01123>
- Hosoda, H., Kato, K., Asano, H., Ito, M., Kato, H., Iwamoto, T., Suzuki, A., Masushige, S., Kida, S., 2009. CBP/p300 is a cell type-specific modulator of CLOCK/BMAL1-mediated transcription. *Mol. Brain* 2, 34. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-2-34>
- Huang, W., Ramsey, K.M., Marcheva, B., Bass, J., 2011. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J. Clin. Invest.* 121, 2133–2141. <https://doi.org/10.1172/JCI46043>
- Hunger, S.P., Ohyashiki, K., Toyama, K., Cleary, M.L., 1992. Hlf, a novel hepatic bZIP protein, shows altered DNA-binding properties following fusion to E2A in t(17;19) acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev.* 6, 1608–1620. <https://doi.org/10.1101/gad.6.9.1608>
- Ikeda, M., Yu, W., Hirai, M., Ebisawa, T., Honma, S., Yoshimura, K., Honma, K.-I., Nomura, M., 2000. cDNA Cloning of a Novel bHLH-PAS Transcription Factor Superfamily Gene, BMAL2: Its mRNA Expression, Subcellular Distribution, and Chromosomal Localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 493–502. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3248>
- Ingiosi, A.M., Schoch, H., Wintler, T., Singletary, K.G., Righelli, D., Roser, L.G., Medina, E., Risso, D., Frank, M.G., Peixoto, L., 2019. Shank3 modulates sleep and expression of circadian transcription factors. *eLife* 8. <https://doi.org/10.7554/elife.42819>
- Inouye, S.T., Kawamura, H., 1979. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 5962–5966. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5962>
- Ivanov, H.Y., Stoyanova, V.K., Popov, N.T., Vachev, T.I., 2015. Autism Spectrum Disorder - A Complex Genetic Disorder. *Folia Med. (Plovdiv)* 57, 19–28. <https://doi.org/10.1515/folmed-2015-0015>
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I.C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., Bourgeron, T., 2003. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat. Genet.* 34, 27–29. <https://doi.org/10.1038/ng1136>
- Jones, C.R., Campbell, S.S., Zone, S.E., Cooper, F., DeSano, A., Murphy, P.J., Jones, B., Czajkowski, L., Ptáček, L.J., 1999. Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat. Med.* 5, 1062–1065. <https://doi.org/10.1038/12502>
- Kaasik, K., Kivimäe, S., Allen, J.J., Chalkley, R.J., Huang, Y., Baer, K., Kissel, H., Burlingame, Alma.L., Shokat, K.M., Ptáček, L.J., Fu, Y.-H., 2013. Glucose Sensor O-GlcNAcylation Coordinates with Phosphorylation to Regulate Circadian Clock. *Cell Metab.* 17, 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.017>
- Katada, S., Sassone-Corsi, P., 2010. The histone methyltransferase MLL1 permits the oscillation of circadian gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1414–1421. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1961>

- Kim, J.Y., Kwak, P.B., Weitz, C.J., 2014. Specificity in circadian clock feedback from targeted reconstitution of the NuRD corepressor. *Mol. Cell* 56, 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.017>
- King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D.L., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., Turek, F.W., Takahashi, J.S., 1997. Positional Cloning of the Mouse Circadian Clock Gene. *Cell* 89, 641–653. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80245-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80245-7)
- Klein, D.C., Moore, R.Y., 1979. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 174, 245–262. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90848-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90848-5)
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M., 1999. mCRY1 and mCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop. *Cell* 98, 193–205. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81014-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81014-4)
- Kurien, P., Hsu, P.-K., Leon, J., Wu, D., McMahon, T., Shi, G., Xu, Y., Lipzen, A., Pennacchio, L.A., Jones, C.R., Fu, Y.-H., Ptáček, L.J., 2019. TIMELESS mutation alters phase responsiveness and causes advanced sleep phase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201819110. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819110116>
- Laan, L.A.E.M., Haeringen, A.V., Brouwer, O.F., 1999. Angelman syndrome: a review of clinical and genetic aspects. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 101, 161–170. [https://doi.org/10.1016/s0303-8467\(99\)00030-x](https://doi.org/10.1016/s0303-8467(99)00030-x)
- Lamia, K.A., Sachdeva, U.M., Ditacchio, L., Williams, E.C., Alvarez, J.G., Egan, D.F., Vasquez, D.S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R.J., Thompson, C.B., Evans, R.M., 2009. AMPK Regulates the Circadian Clock by Cryptochrome Phosphorylation and Degradation. *Science* 326, 437–440. <https://doi.org/10.1126/science.1172156>
- Lavie, P., 1997. Melatonin: role in gating nocturnal rise in sleep propensity. *J. Biol. Rhythms* 12, 657–665. <https://doi.org/10.1177/074873049701200622>
- Ledbetter, D.H., Riccardi, V.M., Airhart, S.D., Strobel, R.J., Keenan, B.S., Crawford, J.D., 1981. Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N. Engl. J. Med.* 304, 325–329. <https://doi.org/10.1056/NEJM198102053040604>
- Lee, J., Lee, Y., Lee, M.J., Park, E., Kang, S.H., Chung, C.H., Lee, K.H., Kim, K., 2008. Dual Modification of BMAL1 by SUMO2/3 and Ubiquitin Promotes Circadian Activation of the CLOCK/BMAL1 Complex. *Mol. Cell. Biol.* 28, 6056–6065. <https://doi.org/10.1128/mcb.00583-08>
- Lee, Y., Lee, J., Kwon, I., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Son, G.H., Lee, K.H., Kim, K., 2010. Coactivation of the CLOCK-BMAL1 complex by CBP mediates resetting of the circadian clock. *J. Cell Sci.* 123, 3547–3557. <https://doi.org/10.1242/jcs.070300>
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., Mori, W., 1958. ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS MELANOCYTES1. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2587–2587. <https://doi.org/10.1021/ja01543a060>
- Li, M.-D., Ruan, H.-B., Hughes, M.E., Lee, J.-S., Singh, J.P., Jones, S.P., Nitabach, M.N., Yang, X., 2013. O-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting BMAL1/CLOCK ubiquitination. *Cell Metab.* 17, 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.015>
- Lintas, C., Persico, A.M., 2008. Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist 46, 1–8. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.060871>
- Liu, A.C., Tran, H.G., Zhang, E.E., Priest, A.A., Welsh, D.K., Kay, S.A., 2008. Redundant Function of REV-ERB $\alpha$  and  $\beta$  and Non-Essential Role for Bmal1 Cycling in

- Transcriptional Regulation of Intracellular Circadian Rhythms. *PLoS Genet.* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000023>
- Liu, C., Chung, M., 2015. Genetics and epigenetics of circadian rhythms and their potential roles in neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Bull.* 31, 141–159. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1495-3>
- Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., Veenstra-Vanderweele, J., 2018. Autism spectrum disorder. *The Lancet* 392, 508–520. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31129-2)
- Lowrey, P.L., 2000. Positional Syntenic Cloning and Functional Characterization of the Mammalian Circadian Mutation tau. *Science* 288, 483–491. <https://doi.org/10.1126/science.288.5465.483>
- Lowrey, P.L., Takahashi, J.S., 2011. Genetics of Circadian Rhythms in Mammalian Model Organisms, in: *Advances in Genetics*. Elsevier, pp. 175–230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387690-4.00006-4>
- Maury, E., Ramsey, K.M., Bass, J., 2010. Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. *Circ. Res.* 106, 447–462. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.208355>
- Menet, J.S., Pescatore, S., Rosbash, M., 2014. CLOCK:BMAL1 is a pioneer-like transcription factor. *Genes Dev.* 28, 8–13. <https://doi.org/10.1101/gad.228536.113>
- Meng, Q.-J., Logunova, L., Maywood, E.S., Gallego, M., Lebiecki, J., Brown, T.M., Sládek, M., Semikhodskii, A.S., Glossop, N.R.J., Piggins, H.D., Chesham, J.E., Bechtold, D.A., Yoo, S.-H., Takahashi, J.S., Virshup, D.M., Boot-Handford, R.P., Hastings, M.H., Loudon, A.S.I., 2008. Setting Clock Speed in Mammals: The CK1 $\epsilon$  tau Mutation in Mice Accelerates Circadian Pacemakers by Selectively Destabilizing PERIOD Proteins. *Neuron* 58, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.019>
- Michael, A.K., Fribourgh, J.L., Chelliah, Y., Sandate, C.R., Hura, G.L., Schneidman-Duhovny, D., Tripathi, S.M., Takahashi, J.S., Partch, C.L., 2017. Formation of a repressive complex in the mammalian circadian clock is mediated by the secondary pocket of CRY1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 1560–1565. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615310114>
- Mindell, J.A., Meltzer, L.J., 2008. Behavioural Sleep Disorders in Children and Adolescents 37, 7.
- Mitsui, S., Yamaguchi, S., Matsuo, T., Ishida, Y., Okamura, H., 2001. Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev.* 15, 995–1006. <https://doi.org/10.1101/gad.873501>
- Miyoshi, K., Morimura, Y., 2010. Clinical Manifestations of Neuropsychiatric Disorders, in: *Neuropsychiatric Disorders*. Springer Japan, pp. 1–14. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-53871-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-4-431-53871-4_1)
- Moore, R.Y., Eichler, V.B., 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42, 201–206. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90054-6)
- Mueller, C.R., Maire, P., Schibler, U., 1990. DBP, a liver-enriched transcriptional activator, is expressed late in ontogeny and its tissue specificity is determined posttranscriptionally. *Cell* 61, 279–291. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90808-r](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90808-r)
- Nagorny, C., Lyssenko, V., 2012. Tired of Diabetes Genetics? Circadian Rhythms and Diabetes: The MTNR1B Story? *Curr. Diab. Rep.* 12, 667–672. <https://doi.org/10.1007/s11892-012-0327-y>

- Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., Guarente, L.P., Sassone-Corsi, P., 2008. The NAD<sup>+</sup>-Dependent Deacetylase SIRT1 Modulates CLOCK-Mediated Chromatin Remodeling and Circadian Control. *Cell* 134, 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.002>
- Neckelmann, D., Mykletun, A., Dahl, A.A., 2007. Chronic Insomnia as a Risk Factor for Developing Anxiety and Depression. *Sleep* 30, 873–880.
- Padmanabhan, K., Robles, M.S., Westerling, T., Weitz, C.J., 2012. Feedback Regulation of Transcriptional Termination by the Mammalian Circadian Clock PERIOD Complex 337, 599–602. <https://doi.org/10.1126/science.1221592>
- Patke, A., Young, M.W., Axelrod, S., 2019. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0179-2>
- Pembrey, M., Fennell, S.J., van den Bergh, J., Fitchett, M., Summers, D., Butler, L., Clarke, C., Griffiths, M., Thompson, E., Super, M., 1989. The association of Angelman's syndrome with deletions within 15q11-13. *J. Med. Genet.* 26, 73–77.
- Phelan, K., McDermid, H.E., 2012. The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). *Mol. Syndromol.* 2, 186–201. <https://doi.org/10.1159/000334260>
- Powell, W.T., Coulson, R.L., Crary, F.K., Wong, S.S., Ach, R.A., Tsang, P., Alice Yamada, N., Yasui, D.H., Lasalle, J.M., 2013. A Prader–Willi locus lncRNA cloud modulates diurnal genes and energy expenditure. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4318–4328. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt281>
- Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014 [WWW Document], n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5919599/> (accessed 8.5.20).
- Qin, L., Ma, K., Wang, Z.-J., Hu, Z., Matas, E., Wei, J., Yan, Z., 2018. Social deficits in Shank3 -deficient mouse models of autism are rescued by histone deacetylase (HDAC) inhibition. *Nat. Neurosci.* 21, 564–575. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0110-8>
- Ralph, M., Foster, R., Davis, F., Menaker, M., 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975–978. <https://doi.org/10.1126/science.2305266>
- Ralph, M.R., Menaker, M., 1988. A Mutation of the Circadian System in Golden Hamsters. *Science* 241, 1225–1227.
- Reick, M., 2001. NPAS2: An Analog of Clock Operative in the Mammalian Forebrain. *Science* 293, 506–509. <https://doi.org/10.1126/science.1060699>
- Richdale, A.L., 1999. Sleep problems in autism: prevalence, cause, and intervention. *Dev. Med. Child Neurol.* 41, 60–66. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1999.tb00012.x>
- Riemann, D., Klein, T., Rodenbeck, A., Feige, B., Horny, A., Hummel, R., Weske, G., Al-Shajlawi, A., Voderholzer, U., 2002. Nocturnal cortisol and melatonin secretion in primary insomnia. *Psychiatry Res.* 113, 17–27. [https://doi.org/10.1016/s0165-1781\(02\)00249-4](https://doi.org/10.1016/s0165-1781(02)00249-4)
- Roane, B.M., Taylor, D.J., 2008. Adolescent Insomnia as a Risk Factor for Early Adult Depression and Substance Abuse. *Sleep* 31, 1351–1356.
- Roenneberg, T., Wirz-Justice, A., Mrosovsky, M., 2003. Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of Human Chronotypes. *J. Biol. Rhythms* 18, 80–90. <https://doi.org/10.1177/0748730402239679>
- Roseboom, P.H., Coon, S.L., Baler, R., Mccune, S.K., Weller, J.L., Klein, D.C., 1996. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in

- serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137, 3033–3045. <https://doi.org/10.1210/endo.137.7.8770929>
- Rosensweig, C., Reynolds, K.A., Gao, P., Laothamatas, I., Shan, Y., Ranganathan, R., Takahashi, J.S., Green, C.B., 2018. An evolutionary hotspot defines functional differences between CRYPTOCHROMES. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03503-6>
- Roybal, K., Theobald, D., Graham, A., DiNieri, J.A., Russo, S.J., Krishnan, V., Chakravarty, S., Peevey, J., Oehrlein, N., Birnbaum, S., Vitaterna, M.H., Orsulak, P., Takahashi, J.S., Nestler, E.J., Carlezon, W.A., McClung, C.A., 2007. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6406–6411. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609625104>
- Sahar, S., Zocchi, L., Kinoshita, C., Borrelli, E., Sassone-Corsi, P., 2010. Regulation of BMAL1 Protein Stability and Circadian Function by GSK3 $\beta$ -Mediated Phosphorylation. *PLoS ONE* 5, e8561. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008561>
- Sanada, K., Okano, T., Fukada, Y., 2002. Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylates and Negatively Regulates Basic Helix-Loop-Helix-PAS Transcription Factor BMAL1. *J. Biol. Chem.* 277, 267–271. <https://doi.org/10.1074/jbc.m107850200>
- Sasaki, M., Yoshitane, H., Du, N.-H., Okano, T., Fukada, Y., 2009. Preferential Inhibition of BMAL2-CLOCK Activity by PER2 Reemphasizes Its Negative Role and a Positive Role of BMAL2 in the Circadian Transcription. *J. Biol. Chem.* 284, 25149–25159. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.040758>
- Savvidis, C., Koutsilieris, M., 2012. Circadian Rhythm Disruption in Cancer Biology. *Mol. Med.* 18, 1249–1260. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00077>
- Shearman, L.P., 2000. Interacting Molecular Loops in the Mammalian Circadian Clock. *Science* 288, 1013–1019. <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1013>
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F., Reppert, S.M., 1997. Two period Homologs: Circadian Expression and Photic Regulation in the Suprachiasmatic Nuclei. *Neuron* 19, 1261–1269. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80417-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80417-1)
- Shi, S., Bichell, T.J., Ihrie, R.A., Johnson, C.H., 2015. Ube3a Imprinting Impairs Circadian Robustness in Angelman Syndrome Models. *Curr. Biol.* 25, 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.047>
- Shim, H.S., Kim, H., Lee, J., Son, G.H., Cho, S., Oh, T.H., Kang, S.H., Seen, D.-S., Lee, K.H., Kim, K., 2007. Rapid activation of CLOCK by Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase C mediates resetting of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep.* 8, 366–371. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400920>
- Shirogane, T., Jin, J., Ang, X.L., Harper, J.W., 2005. SCF $\beta$ -TRCP Controls Clock-dependent Transcription via Casein Kinase 1-dependent Degradation of the Mammalian Period-1 (Per1) Protein. *J. Biol. Chem.* 280, 26863–26872. <https://doi.org/10.1074/jbc.m502862200>
- Soorya, L., Kolevzon, A., Zweifach, J., Lim, T., Dobry, Y., Schwartz, L., Frank, Y., Wang, A.T., Cai, G., Parkhomenko, E., Halpern, D., Grodberg, D., Angarita, B., Willner, J.P., Yang, A., Canitano, R., Chaplin, W., Betancur, C., Buxbaum, J.D., 2013. Prospective investigation of autism and genotype-phenotype correlations in 22q13 deletion syndrome and SHANK3 deficiency. *Mol. Autism* 4, 18. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-18>
- Spencer, S., Falcon, E., Kumar, J., Krishnan, V., Mukherjee, S., Birnbaum, S.G., McClung, C.A., 2013. Circadian genes *Period 1* and *Period 2* in the nucleus accumbens regulate

- anxiety-related behavior. *Eur. J. Neurosci.* 37, 242–250.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.12010>
- Stephan, F.K., Zucker, I., 1972. Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69, 1583–1586. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.6.1583>
- Stratmann, M., Stadler, F., Tamanini, F., Van Der Horst, G.T.J., Ripperger, J.A., 2010. Flexible phase adjustment of circadian albumin D site-binding protein (Dbp) gene expression by CRYPTOCHROME1. *Genes Dev.* 24, 1317–1328.  
<https://doi.org/10.1101/gad.578810>
- Sutcliffe, J.S., Jiang, Y.-H., Galjaard, R.-J., Matsuura, T., Fang, P., Kubota, T., Christian, S.L., Bressler, J., Cattanch, B., Ledbetter, D.H., Beaudet, A.L., 1997. The E6–AP Ubiquitin–Protein Ligase (UBE3A) Gene Is Localized within a Narrowed Angelman Syndrome Critical Region. *Genome Res.* 7, 368–377.  
<https://doi.org/10.1101/gr.7.4.368>
- Takahashi, J.S., 2017. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat. Rev. Genet.* 18, 164–179. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150>
- Tamaru, T., Hirayama, J., Isojima, Y., Nagai, K., Norioka, S., Takamatsu, K., Sassone-Corsi, P., 2009. CK2 $\alpha$  phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 446–448. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1578>
- Tamayo, A.G., Duong, H.A., Robles, M.S., Mann, M., Weitz, C.J., 2015. Histone monoubiquitination by Clock–Bmal1 complex marks Per1 and Per2 genes for circadian feedback. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 759–766.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.3076>
- Toh, K.L., 2001. An hPer2 Phosphorylation Site Mutation in Familial Advanced Sleep Phase Syndrome. *Science* 291, 1040–1043.  
<https://doi.org/10.1126/science.1057499>
- Trott, A.J., Menet, J.S., 2018. Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1. *PLOS Genet.* 14, e1007156.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007156>
- Vanselow, K., Vanselow, J.T., Westermarck, P.O., Reischl, S., Maier, B., Korte, T., Herrmann, A., Herzog, H., Schlosser, A., Kramer, A., 2006. Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). *Genes Dev.* 20, 2660–2672.  
<https://doi.org/10.1101/gad.397006>
- Vitale, J.A., Roveda, E., Montaruli, A., Galasso, L., Weydahl, A., Caumo, A., Carandente, F., 2015. Chronotype influences activity circadian rhythm and sleep: Differences in sleep quality between weekdays and weekend. *Chronobiol. Int.* 32, 405–415.  
<https://doi.org/10.3109/07420528.2014.986273>
- von Gall, C., Duffield, G.E., Hastings, M.H., Kopp, M.D.A., Dehghani, F., Korf, H.-W., Stehle, J.H., 1998. CREB in the Mouse SCN: A Molecular Interface Coding the Phase-Adjusting Stimuli Light, Glutamate, PACAP, and Melatonin for Clockwork Access. *J. Neurosci.* 18, 10389–10397. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-24-10389.1998>
- Wessten, N.J., Balkin, T.J., Reichardt, R.M., Kautz, M.A., Saviolakis, G.A., Belenky, G., 2005. Daytime sleep and performance following a zolpidem and melatonin cocktail. *Sleep* 28, 93–103. <https://doi.org/10.1093/sleep/28.1.93>
- Winston, J.T., Koepp, D.M., Zhu, C., Elledge, S.J., Harper, J.W., 1999. A family of mammalian F-box proteins. *Curr. Biol. CB* 9, 1180–1182.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)80021-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)80021-4)



- Xu, H., Gustafson, C.L., Sammons, P.J., Khan, S.K., Parsley, N.C., Ramanathan, C., Lee, H.-W., Liu, A.C., Partch, C.L., 2015. Cryptochrome 1 regulates the circadian clock through dynamic interactions with the BMAL1 C-terminus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 476–484. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3018>
- Xu, Y., Padiath, Q.S., Shapiro, R.E., Jones, C.R., Wu, S.C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptáček, L.J., Fu, Y.-H., 2005. Functional consequences of a CKI $\delta$  mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* 434, 640–644. <https://doi.org/10.1038/nature03453>
- Yamaguchi, S., Mitsui, S., Yan, L., Yagita, K., Miyake, S., Okamura, H., 2000. Role of DBP in the Circadian Oscillatory Mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4773–4781. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.13.4773-4781.2000>
- Yamazaki, S., 2000. Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science* 288, 682–685. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.682>
- Yin, L., 2006. Nuclear Receptor Rev-erb Is a Critical Lithium-Sensitive Component of the Circadian Clock. *Science* 311, 1002–1005. <https://doi.org/10.1126/science.1121613>
- Yin, L., Joshi, S., Wu, N., Tong, X., Lazar, M.A., 2010. E3 ligases Arf-bp1 and Pam mediate lithium-stimulated degradation of the circadian heme receptor Rev-erb $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11614–11619. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000438107>
- Yoo, S.-H., Jennifer, Sandra, Shan, Y., Seong, Hong, H.-K., Kornblum, I., Kumar, V., Koike, N., Xu, M., Nussbaum, J., Liu, X., Chen, Z., Zhijian, Carla, Joseph, 2013. Competing E3 Ubiquitin Ligases Govern Circadian Periodicity by Degradation of CRY in Nucleus and Cytoplasm. *Cell* 152, 1091–1105. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.055>
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepk, S.M., Hong, H.-K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M., Takahashi, J.S., 2004. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 5339–5346. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308709101>
- Yoshitane, H., Takao, T., Satomi, Y., Du, N.-H., Okano, T., Fukada, Y., 2009. Roles of CLOCK Phosphorylation in Suppression of E-Box-Dependent Transcription. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3675–3686. <https://doi.org/10.1128/mcb.01864-08>
- Zisapel, N., 2007. Sleep and sleep disturbances: biological basis and clinical implications. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1174–1186. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6529-9>
- Zisapel, N., 2000. Development of a melatonin-based formulation for the treatment of insomnia in the elderly. *Drug Dev. Res.* 50, 226–234. [https://doi.org/10.1002/1098-2299\(200007/08\)50:3/4<226::AID-DDR6>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1098-2299(200007/08)50:3/4<226::AID-DDR6>3.0.CO;2-S)